

Endothelial CCR2 Promotes Pulmonary Metastasis

Dissertation

zur

Erlangung der naturwissenschaftlichen Doktorwürde

(Dr. sc. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Zürich

von

Marko Roblek

aus

Slowenien

Promotionskomitee

Prof. Dr. Anne Müller (Vorsitz)

PD Dr. Lubor Borsig (Leitung)

Prof. Dr. Maries van den Broek

Prof. Dr. Stefan Schneider

Zürich, 2015

Table of Contents	5
Summary	7
Zusammenfassung	8
List of Abbreviations	10
Introduction	12
1. Cancer	12
1. 1. Introduction	12
1. 2. Inflammation and cancer development	13
2. Metastasis	15
2. 1. Introduction	15
2. 2. Colorectal-, lung-carcinoma, and melanoma statistics	16
2. 3. Primary tumor – invasion	17
2. 4. Cancer cells in circulation	18
2. 5. Cancer cell binding to endothelium and extravasation	19
2. 6. Metastatic expansion	20
2. 7. Homeostatic chemokines and organ-specific metastatic seeding	21
3. Chemokines	22
3. 1. Introduction	22
3. 2. Regulation of inflammatory chemokine ligands and receptors	23
3. 3. Influence of inflammatory chemokines on cancer microenvironment	24
3. 4. Chemokine signaling	25
3. 5. Inflammatory chemokines in mouse physiology	27
3. 6. Pharmacological targeting of chemokine receptors	28
4. Endothelial cells	31
4. 1. Introduction	31
4. 2. Endothelial integrity	32
4. 3. Vascular adhesion proteins	33
4. 4. Endothelial regulation of cancer cells	34
4. 5. Inflammatory chemokines and endothelium	35
4. 6. Induction of endothelial permeability	36
5. Leukocytes in cancer and metastatic spread	40
5. 1. Introduction	40
5. 2. Leukocytes and metastasis initiation	41
5. 3. Leukocytes and immune-suppression	42

TABLE OF CONTENTS

5. 4. Leukocytes and inflammatory chemokines.....	43
6. Scientific aim.....	46
7. References.....	47
Results	55
<u>Manuscript</u> : Targeting of CCL2-CCR2-glycosaminoglycan axis using a CCL2 decoy protein attenuates metastasis through inhibition of tumor cell seeding.....	55
<u>Manuscript</u> : Targeted delivery of CCR2 antagonist to activated pulmonary endothelium prevents metastasis.....	83
<u>Manuscript</u> : Endothelial CCR2 activation leads to actin-myosin contraction and enables pulmonary metastatic seeding.....	102
Discussion	138
1. Pharmacological inhibition of CCL2 or CCR2 inhibits generation of metastasis.....	138
2. Genetic mouse model of endothelial specific CCR2 knockout.....	141
3. Conclusion and outlook.....	142
4. References.....	145
Acknowledgements	147
Curriculum vitae	148
Appendix	150
<u>Article</u> : The role of VLA-4 binding for experimental melanoma metastasis and its inhibition by heparin.....	150
<u>Review</u> : Inflammatory chemokines and metastasis-tracing the accessory.....	158

Summary

Nine out of ten cancer patients die due to metastasis. The generation of them is dependent on several factors, including the recruitment of inflammatory monocytes and activation of endothelial cells at the pre-metastatic niche. It is at these sites where cancer cell seeding of the targeted secondary tissue is taking place. Inflammatory chemokines, especially the chemokine ligand CCL2 and its receptor CCR2, are regulating several aspects of the metastatic cascade, including monocyte recruitment to the metastatic niche and induction of vascular permeability enabling cancer cell trans-endothelial migration. We aimed to target the CCL2-CCR2 signaling axis at the pre-metastatic niche by pharmacological inhibition and a genetic endothelial specific CCR2 knockout (CCR2^{ec}KO) mouse model.

A mutant signaling deficient dnCCL2-HSA chimera strongly inhibited cancer cell trans-endothelial migration as well as cancer cell seeding to the lung. As a consequence the metastatic burden was strongly decreased in dnCCL2-HSA treated mice. The anti-metastatic effect of dnCCL2-HSA was dependent on its inhibition of cancer cell induced vascular permeability, while recruitment of inflammatory monocytes to the pre-metastatic niche was not impaired. dnCCL2-HSA was found to be present in close proximity to cancer cells in the lung vasculature, indicating that local inhibition of CCR2 signaling is sufficient to prevent metastasis initiation. Furthermore, targeting of cancer cell activated endothelial cells by VCAM-1 binding peptide equipped liposomes loaded with a CCR2 antagonist confirmed that inhibition of CCR2 at sites of activated endothelium is sufficient to prevent the generation of metastases. The spatial inhibition of CCR2 using these liposomes interfered with induction of vascular permeability, but spared any detectable effects on inflammatory monocytes. The endothelial specific CCR2 knockout (CCR2^{ec}KO) mouse model confirmed findings from both inhibitor approaches. Spontaneous lung metastasis was strongly reduced in CCR2^{ec}KO mice compared to control littermates. Leukocyte recruitment to the primary tumor, the pre-metastatic niche, and the metastatic environment however, was not affected due to the endothelial CCR2 knockout. Stimulation of endothelial cells with CCL2 caused phosphorylation of MLC2, which is required for endothelial cell retraction.

Overall we could show that endothelial CCR2 is the gatekeeper for cancer cell trans-endothelial migration and thus represents the final check-point for metastasis initiation of colon and lung cancer cells. Targeting endothelial CCR2 at pre-metastatic sites represents a promising treatment strategy to prevent cancer cell seeding and thus metastatic spread to the lung.

Zusammenfassung

Neun von zehn Krebspatienten sterben aufgrund von Metastasen. Die Metastasenbildung hängt von zahlreichen Faktoren ab. Zu diesen zählen die Rekrutierung von Monozyten und die Aktivierung von Endothelzellen in der pre-metastatischen Nische. In diesem speziellen Bereich werden Organe von Krebszellen neu besiedelt. Chemokine, im Speziellen der Ligand CCL2 und dessen Rezeptor CCR2, regulieren viele Mechanismen der Metastasierung, wie zum Beispiel die Rekrutierung von Monozyten und die Induktion der vaskulären Permeabilität, welche es den Krebszellen erlaubt die Endothelschicht zu passieren. Unser Ziel war es die Signalinduktion von CCL2-CCR2 in der pre-metastatischen Nische mit pharmakologischen Mitteln und in einem genetischen Mausmodell (CCR2^{ec}KO) zu blockieren.

Ein mutiertes nicht Signal-induzierendes dnCCL2-HSA Chimerprotein verringerte sowohl die Transendothelmigration als auch die Ansiedelung von Krebszellen in der Lunge. Folglich war die Metastasenbelastung in dnCCL2-HSA-behandelten Mäusen stark verringert. Das anti-metastatische Potential von dnCCL2-HSA hing von der Inhibierung der vaskulären Permeabilität ab, die von Krebszellen induziert wird. Hingegen wurde die Rekrutierung von Monozyten zur pre-metastatischen Nische nicht beeinflusst. dnCCL2-HSA wurde in der Nähe von Krebszellen detektiert. Dies indiziert, dass lokale Inhibierung von CCR2 ausreichend ist um Metastasierung zu unterbinden. Inhibierung von Krebszell-aktiviertem Endothel mit VCAM-1 Bindungspeptid ausgestatteten Liposomen, welche mit einem CCR2 Inhibitor beladen waren, bestätigten, dass die Inhibierung von CCR2 im Bereich von aktiviertem Endothel ausreichend ist um die Bildung von Metastasen zu unterbinden. Die räumlich definierte Inhibierung von CCR2 mit diesen Liposomen verringerte die Induktion der vaskulären Permeabilität, hatte aber keinen Effekt auf die Rekrutierung von Monozyten. Das endothelspezifische CCR2 Knockout (CCR2^{ec}KO) Mausmodell bestätigte Ergebnisse beider pharmakologischen Ansätze. Spontane Lungenmetastasen waren in CCR2^{ec}KO verglichen mit Kontrollmäusen stark reduziert. Die Rekrutierung von Leukozyten zum Primärtumor, zur pre-metastatischen Nische und zum metastatischen Gewebe war hingegen nicht beeinträchtigt. Zudem führte die Stimulierung von Endothelzellen mit CCL2 zur Phosphorylierung von MLC2, welches für die Endothelzellkontraktion essentiell ist.

Zusammengefasst konnten wir zeigen, dass endotheliales CCR2 als ein Torwächter für die Transendothelmigration von Krebszellen fungiert und somit den letzten Kontrollpunkt für die Bildung von Lungenmetastasen von Darm- und Lungenkrebszellen darstellt. Die Inhibierung von endothelialen CCR2 in den pre-metastatischen Bereichen stellt einen erfolgsversprechenden Ansatz zur Reduktion der Metastasenbelastung in der Lunge dar.